

Poszukiwanie antygenów wzbudzających odporność przeciwko inwazjom tęgoryjców

Search for protective antigens of hookworms

Marcin Wiśniewski¹, Ewa Długosz¹, Piotr Baska¹ i Halina Wędrychowicz^{1,2}

¹Zakład Parazytologii i Inwazjologii, Katedra Nauk Przedklinicznych, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, SGGW, ul. Ciszewskiego 8, 02-786 Warszawa

²Instytut Parazytologii im. Witolda Stefańskiego, Polska Akademia Nauk, ul Twarda 51/55, 00-818 Warszawa

Adres do korespondencji: Marcin Wiśniewski, E-mail: wisniewskim@alpha.sggw.waw.pl

ABSTRACT. Hookworms are very important blood sucking nematode parasites of humans and domestic animals. The host with a heavy infection can lose almost a cup of blood per day. This may contribute to anemia which is associated with many physical and mental developmental insults. The works on obtaining an effective hookworm vaccine have been lasting for about eighty years. Recent identifications of a number of bioactive molecules produced by larval and adult stages of Ancylostomatidae are very helpful for selecting of nematode proteins crucial for host-parasite interactions and promising vaccine antigens. Many of these molecules are involved in host skin penetration by infective larvae, intestinal tissue invasion and digestion of haemoglobin and/or other macromolecular substrates. However, the results of many vaccination trials using recombinant forms of these proteins showed no sufficient protection against experimental hookworm infections.

Key words: hookworm infections, recombinant antigens, vaccine trials.

Wstęp

Od wielu już lat badania związane z opracowaniem skutecznej obrony przeciwko większości chorób pasożytniczych koncentrują się nad konstrukcją skutecznej i stosunkowo niedrogiej szczepionki. Niestety, mimo pewnych sukcesów na tym polu, nadal nie uzyskano przeciwko wielu pasożytom wyników, które umożliwiłyby wprowadzenie otrzymanych rozwiązań do powszechnego użycia. W przypadku tęgoryjczy badania nad opracowaniem skutecznej szczepionki trwają już od początków XIX wieku, ale nadal brak takowej na rynku. Pierwsze publikacje dotyczące immunizacji przeciwko inwazjom tęgoryjców pochodzą z lat trzydziestych ubiegłego wieku. Przeprowadzono próby uzyskania odporności u psów lub myszy na inwazje *Ancylostoma caninum* poprzez kontrolowane ich zarażenie żywymi larwami L3 tego nicienia [1-4]. Immunizo-

wane w ten sposób zwierzęta wykazywały łagodniejsze objawy chorobowe. Ponadto, w przeciwieństwie do grupy kontrolnej, nie obserwowano skutków śmiertelnych przy stosowaniu wysokich dawek larw inwazyjnych. I choć nie udało się uzyskać pełnej ochrony przed inwazją *A. caninum*, to jednak zauważono znaczną redukcję liczby dorosłych nicieni zasiedlających jelito uodpornianych zwierząt.

W latach sześćdziesiątych ubiegłego stulecia rozpoczęto badania z wykorzystaniem larw inwazyjnych tęgoryjców osłabionych promieniowaniem gamma. Opracowano i wprowadzono na rynek skuteczną szczepionkę przeciwko *A. caninum*, zawierającą odpowiednią dawkę L3 napromieniowanych promieniami γ [5]. Jednak mimo dostatecznie dużej skuteczności, została ona wycofana z rynku ze względów ekonomicznych. Na jej niekorzyść przemawiały trudności w zdobyciu wystarczającej licz-

by larw inwazyjnych niezbędnych do masowych szczepień [6]. Brano również pod uwagę możliwość wywołania stanu chorobowego, jeśli osłabianie larw przebiegłoby w sposób nieprawidłowy lub osobnik, któremu podano szczepionkę okazałby się wyjątkowo wrażliwy. Mimo wszystko, wyniki uzyskane podczas immunizacji osłabionymi larwami L3 pokazały, że antygeny postaci inwazyjnych wywołują odpowiedź immunologiczną żywiciela chroniącą go przed inwazją pasożyta. Dlatego poszukuje się skutecznych antygenów szczepionkowych między innymi wśród białek tego stadium rozwojowego nicienia.

Trudności, jakie pojawiają się w opracowaniu szczepionek wynikają z konieczności doboru odpowiedniego antygeny, który powinien być swoisty dla pasożyta i ochronny dla żywiciela. Niestety to, że antygen jest wysoce immunogenny nie jest jednoznaczne z tym, że będzie wywoływał odpowiedź immunologiczną chroniącą organizm żywiciela przed inwazją pasożyta. Wszystko to sprawia, że poszukiwanie nowych antygenów, które okazałyby się skuteczne w walce przeciwko tęgoryjcom trwa. W ostatnich latach wiele uwagi poświęcono białkom odgrywającym kluczową rolę w procesie zamknięcia cyklu życiowego pasożyta w organizmie żywiciela. W próbach szczepionkowych wykorzystano enzymy pasożyta uczestniczące w penetracji przez skórę żywiciela, migracji przez tkanki, odżywianiu się, czy obronie przed układem immunologicznym żywiciela.

Antygeny wydaliniczo-wydzielnicze larw tęgoryjców

Grupą antygenów, z którymi wiąże się ogromne nadzieje, są białka wydzielane przez larwy na etapie przekształcania się ze stadium L3 wolno żyjącego w L3 pasożytnicze (ssL3: ang. serum stimulated L3, larwy L3 stymulowane surowicą). Białka wydzielnicze tęgoryjców to w większości białka zawierające domenę SCP (Sperm Coating Protein) po raz pierwszy scharakteryzowaną w glikoproteinach spermy gryzoni. Uważa się, że domena ta ma funkcję Ca^{2+} zależnej protezy serynowej. Wiele białek zawierających domenę SCP to białka bogate w cysteinę (CRISP — cysteine rich secretory proteins). W poznanej strukturze domeny SCP wykazano obecność kieszeni wiążącej wapń przez 2 histydyny i glutaminian [7]. Brak jest danych literaturowych określających jednoznacznie rolę białek zawierających domenę SCP. Trudno również wyrokować

o funkcji ASP na podstawie przynależności ich do białek CRISP, gdyż białka tego typu pełnią wiele rozmaitych funkcji. Możliwe jest, że białka ASP pełnią rolę w angiogenezie, jak ich homolog u *Onchocerca volvulus* [8], ale hipotezę tę poddaje w wątpliwość fakt, że homologi ASP występują także u wolno żyjącego nicienia *Caenorhabditis elegans*. U tęgoryjców ASP zostały zlokalizowane w kutikuli, gruczołach wydzielniczych i w wydzielinach pasożyta. Badania z wykorzystaniem mikromacierzy DNA wykazują, że 7 z 8 genów kodujących ASP *A. caninum* ulega transkrypcji i translacji w stadium L3, podczas gdy uwalniane są w stadium ssL3 [9]. Sądzi się, że biorą one udział w ochronie tych nicieni przed skutkami odpowiedzi immunologicznej żywiciela. Ich funkcja nie została jednak jednoznacznie potwierdzona [10]. mRNA białka sekrecyjnego 2 *Ancylostoma caninum* zostało wykryte metodą RT-PCR we wszystkich stadiach rozwojowych nicienia [11]. Mimo, że *Ac-asp-2* ulega transkrypcji w wolno żyjących stadiach rozwojowych, białko nie jest wydzielane aż do momentu zasiedlenia żywiciela i osiągnięcia stadium ssL3. Moment uwalniania białek sekrecyjnych sugeruje, że są one przystosowaniem tęgoryjców do pasożytniczego trybu życia i należą do grupy białek PRP (Pathogenesis Related Proteins). Hipoteza ta jest wspierana przez fakt, że białko sekrecyjne 1 *Necator americanus* wykazuje właściwości immunomodulacyjne, gdyż zwiększa poziom mRNA IL4 u żywiciela.

Jako jeden z pierwszych sklonowano cDNA kodujące tego typu antygeny *Ancylostoma caninum*. Nazwano je odpowiednio: ASP-1 i ASP-2 [11] (ASP — *Ancylostoma Secreted Protein*). Trzykrotna immunizacja myszy rekombinowanym ASP-1 zapewniała 79% redukcję inwazji *Ancylostoma caninum* [12]. Wykorzystując silnie konserwatywne regiony sekwencji genów kodujących białka sekrecyjne *A. caninum* sklonowano również cDNA kodujące homologiczne białka *A. duodenale*, *A. ceylanicum* i *N. americanus* [13]. Ich rekombinowane postaci, otrzymane w prokariotycznych układach ekspresyjnych, wykorzystane w próbach szczepionkowych przeciwko inwazji *A. caninum* dały w myszach odpowiednio 62% redukcję liczby nicieni docierających do płuc w przypadku immunizacji białkiem sekrecyjnym *N. americanus* i tylko 28% w przypadku *A. duodenale*. Te różnice wynikały z różnego stopnia homologii badanych białek; im był on wyższy, tym większy obserwowano procent redukcji liczby nicieni [14].

Obecnie trwają też badania nad oceną skuteczno-

ści innych potencjalnych antygenów szczepionkowych wydzielanych przez larwy L3 *A. caninum*, między innymi metaloproteazy o masie 62 kDa (Ac-MTP-1) [15] i esterazy acetylocholinowej o masie 60 kDa. Wstępne próby szczepionkowe z wykorzystaniem omawianej metaloproteazy wykazały, że istnieje ścisłe powiązanie pomiędzy redukcją liczby nicieni zasiedlających jelito immunizowanych psów a mianem swoistych przeciwciał IgG2 anty-Ac-MTP-1. W przypadkach wysokiego miana tych przeciwciał stwierdzano 50% redukcję liczby nicieni zasiedlających jelito szczepionych zwierząt [16].

Antygeny dorosłych nicieni

Inną grupę antygenów szczepionkowych stanowią białka dorosłych tęgoryjców. Prowadzone są badania z wykorzystaniem tkankowego inhibitora metaloproteaz [17] oraz inhibitorów proteaz serynowych umożliwiających tęgoryjcom hamowanie krzepnięcia krwi żywiciela. Sklonowano cDNA kodujące kilka izoform inhibitorów krzepliwości krwi *Ancylostoma caninum* oraz jednego *A. ceylanicum*, które ze względu na pełnioną funkcję w odżywianiu się pasożytów mogą stać się skutecznym narzędziem w zwalczaniu inwazji tęgoryjców [18-21]. Jednak ciągle jeszcze brakuje wyników prób szczepionkowych.

Zespół w Yale University pod kierunkiem doktora M. Cappello pracuje również nad innym potencjalnym antygenem szczepionkowym *A. caninum* — inhibitorem agregacji płytek krwi. W dotychczasowych badaniach wykazano, że inhibitor ten poprzez wiązanie się z receptorami komórkowymi — GPIIb/IIIa i GPIa/IIa hamuje agregację płytek krwi, co ma również istotne znaczenie w odżywianiu się pasożyta [22].

Z kolei Ali i wsp. [23] badali czynnik inhibicji neutrofilów *A. ceylanicum*. Trzykrotna podskórna immunizacja rekombinowaną postacią antygeny nie spowodowała redukcji liczby robaków, ale stwierdzono wysokie miano swoistych przeciwciał w surowicy oraz znaczne zmniejszenie liczby jaj uwalnianych przez nicienie.

Prowadzono również próby szczepień z wykorzystaniem inhibitora proteaz serynowych (Kunitz-type serine protease inhibitor, AceKI) wydzielanego przez *A. ceylanicum*. Milstone i wsp. [24] wykazali *in vitro*, że hamuje on aktywność między innymi takich enzymów żywiciela jak: chymotrypsyna, elastaza trzustkowa i trypsyna. W badaniach nad oceną

skuteczności rekombinowanej postaci tego białka jako antygeny szczepionkowego wykazano brak opóźnień w rozwoju fizycznym na skutek inwazji *A. ceylanicum* immunizowanych nim chomików, obserwowany w grupach kontrolnych. Immunizacja AceKI częściowo chroniła przed skutkami inwazji tęgoryjców, mimo że nie zanotowano istotnych różnic ani w liczbie nicieni zasiedlających jelito chomików, ani w poziomie hemoglobiny w grupach szczepionych i kontrolnych [25].

Bungiro i wsp. [26, 27] sklonowali cDNA dwóch białek ekskrecyjno-sekrecyjnych dorosłych *A. ceylanicum*. Opisane wyniki szczepienia chomików rekombinowanym białkiem AceES-2 pokazują, że jest ono wysoce immunogenne, ale nie daje ochrony przed inwazją pasożyta.

Kolejną grupą białek pasożytniczych badanych pod kątem wykorzystania w szczepieniach przeciwko inwazjom krwio pijnych nicieni są tzw. antygeny ukryte, których źródłem jest wewnętrzna powierzchnia jelita robaka. Ich nazwa wywodzi się stąd, że podczas inwazji antygeny te nie są prezentowane układowi immunologicznemu żywiciela. Jako pierwszy został opisany polimer — kontortyna, związany z powierzchnią kosmków jelitowych *Haemonchus contortus*, nicienia pasożytującego u przeżuwaczy [28]. Immunizacja zwierząt tym antygenem dawała średnio 75% redukcję liczby pasożytów [29]. Do tej grupy należy też kompleks antygenów określane jako H-gal-GP (ang. *Haemonchus galactose containing glycoprotein complex*). W jego skład wchodzi takie enzymy, jak: proteaza asparaginianowa [30], cztery metalopeptydazy [31], a N-koniec kompleksu ma właściwości proteazy cysteinowej [32]. Przypisuje mu się potencjalną rolę w trawieniu hemoglobiny. Próby immunizacji owiec wykazały, że antygen ten powoduje redukcję liczby wydalanych jaj o 93% oraz zmniejszenie liczby robaków zasiedlających trawieniec o 72% [32].

Cytowane powyżej wyniki przyczyniły się do tego, że rozpoczęto poszukiwania antygenów tęgoryjców, których geny ulegają ekspresji w jelicie pasożyta. Opisano kilka białek *Ancylostoma caninum* wykazujących podobieństwo do antygenów jelitowych *H. contortus*: Ac-MEP-1 — *Ancylostoma caninum* metaloendopeptydaza 1 [33], dwie proteazy cysteinowe (Ac-CP-1 i Ac-CP-2) [34, 35] oraz dwie proteazy asparaginianowe (Ac-APR-1, Ac-APR-2) [36–38]. Obecność tych białek w jelicie pasożyta potwierdzono immunohistochemicznie. Zarówno w przypadku dorosłej postaci *N. americanus*, jak i *A. caninum* wykazano immunohistochemicznie

obecność proteazy asparaginianowej w jelicie oraz w amfidalnych i wydzielniczych gruczołach nicieni [38, 39]. Okazało się, że larwy inwazyjne L3 *A. caninum* i *N. americanus* inkubowane w roztworze surowicy zawierającej przeciwciała przeciwko rekombinowanemu proteazom asparaginianowym Ac-APR-1 i Na-APR-1 traciły zdolność przenikania przez skórę chomika [38]. Dodatkowo wykazano *in vitro*, że proteazy asparaginianowe tęgoryjców *A. caninum* i *N. americanus* hydrolizują hemoglobinę zarówno ludzką jak i psią, która stanowi dla nich jeden z podstawowych surowców odżywczych, źródło aminokwasów [37–39]. Ponadto autorzy cytowanych prac przedstawili wyniki, które dowodzą, że badane proteazy rozkładają efektywniej hemoglobinę pochodzącą od żywiciela swoistego dla pasożyta. Może to świadczyć o zachodzących w ewolucji, określonych zmianach w układzie pasożyt-żywiciela, na szlaku enzym-substrat, dzięki którym dany gatunek tęgoryjców mógł przetrwać w organizmie swoistego dla siebie żywiciela [40].

Mimo zaawansowanych prac w wybitnych światowych ośrodkach badawczych, nadal brak jest skutecznej szczepionki przeciwko tęgoryjcom. Najnowsze wyniki badań znacznie przyczyniły się do poznania biologicznej roli wielu antygenów pasożytniczych, co umożliwiło poznanie różnych mechanizmów, dzięki którym tęgoryjce mogą zamknąć swój cykl życiowy w organizmie żywiciela. Trudności, jakie pojawiają się podczas badania wielu rekombinowanych antygenów, wynikają z różnic w budowie przestrzennej badanych białek. Ze względu na modyfikacje potranslacyjne, charakterystyczne dla Eukaryota, niemożliwe jest uzyskanie natywnych antygenów w stosunkowo tanich układach ekspresyjnych prokariotycznych. Stąd obecnie trwają też próby z uzyskaniem białek pasożytniczych w komórkach eukariotycznych. Jednak i tu wybór określonego układu ekspresyjnego często jest determinowany pewnymi różnicami w modyfikacjach potranslacyjnych, trochę innych w przypadku komórek drożdży, owadów czy ssaków. Przykładowo, w komórkach owadzych nie występuje dołączanie N-acetyloglukozoaminy do reszt cukrowych glikozylowanych białek, co oznacza, że oligosacharydy dołączane do syntetyzowanych białek są krótsze. Te różnice w ostatecznej budowie białek uzyskiwanych w różnych układach ekspresyjnych mogą mieć decydujący wpływ na wykazywaną przez nie antygenowość [41].

Można mieć nadzieję, że zdobyta wiedza i najnowsze osiągnięcia z wykorzystaniem inżynierii ge-

netycznej przyczynią się do opracowania wyczekiwanej szczepionki.

Literatura

- [1] McCoy O.R. 1931. Immunity reactions of the dog against hookworm (*Ancylostoma caninum*) under conditions of repeated infection. *American Journal of Hygiene* 14: 268–303.
- [2] Foster A.O. 1935. The immunity of dogs to *Ancylostoma caninum*. *American Journal of Hygiene* 22: 65–105.
- [3] Kerr K.B. 1936. Studies on acquired immunity to the dog *Ancylostoma caninum*. *American Journal of Hygiene* 23: 381–406.
- [4] Otto G.F., Kerr K.B. 1939. The immunization of dogs against hookworm *Ancylostoma caninum*, by subcutaneous injection of graded doses of larvae. *American Journal of Hygiene* 33(D): 23–27.
- [5] Miller T.A. 1978. Industrial development and field use of the canine hookworm vaccine. *Advances in Parasitology* 16: 333–342.
- [6] Emery D.L. 1996. Vaccination against worm parasites of animals. *Veterinary Parasitology* 64: 31–45.
- [7] Fernandez C., Szyperski T., Bruyere T., Ramage P., Mosinger E., Wuthrich K. 1997. NMR solution structure of the pathogenesis-related protein P14a. *Journal of Molecular Biology* 266: 576–593.
- [8] Tawe W., Pearlman E., Unnasch T.R., Lustigman S. 2000. Angiogenic activity of *Onchocerca volvulus* recombinant proteins similar to vespilid venom antigen 5. *Molecular and Biochemical Parasitology* 109: 91–99.
- [9] Moser J.M., Freitas T., Arasu P., Gibson G. 2005. Gene expression profiles associated with the transition to parasitism in *Ancylostoma caninum* larvae. *Molecular and Biochemical Parasitology* 143: 39–48.
- [10] Zhan B., Liu Y., Badamchian M., Williamson A., Feng J., Loukas A., Hawdon J.M., Hotez P.J. 2003. Molecular characterisation of the *Ancylostoma*-secreted protein family from the adult stage of *Ancylostoma caninum*. *International Journal for Parasitology* 33: 897–907.
- [11] Hawdon J.M., Narasimhan S., Hotez P.J. 1999. *Ancylostoma* secreted protein 2: cloning and characterization of a second member of a family of nematode secreted proteins from *Ancylostoma caninum*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 99: 149–165.
- [12] Gosh K., Hawdon J.M., Hotez P.J. 1996. Vaccination with alum-precipitated ASP-1 protects mice against challenge infections with infective hookworm (*Ancylostoma caninum*) larvae. *The Journal of Infectious Diseases* 174: 1380–1383.
- [13] Zhan B., Hawdon J.M., Shan Q., Ren H.N., Qiang H.Q., Hu W., Xiao S.H., Li T.H., Gong X., Feng Z., Hotez P.J. 1999. *Ancylostoma* secreted protein-1

- (ASP-1) homologues from human hookworms. *Molecular and Biochemical Parasitology* 98: 143–149.
- [14] Liu Sen., Ghosh K., Zhan B., Shan Q., Thompson G., Hawdon J.M., Koski A., Shuhua X., Hotez P.J. 2000. Hookworm burden reductions in BALB/c mice vaccinated with recombinant *Ancylostoma* secreted proteins (ASPs) from *Ancylostoma duodenale*, *Ancylostoma caninum* and *Necator americanus*. *Vaccine* 18: 1096–1102.
- [15] Zhan B., Hotez P.J., Wang Y., Hawdon J.M., 2002. A developmentally regulated metalloprotease secreted by host-stimulated *Ancylostoma caninum* third-stage infective larvae is a member of the astacin family of proteases. *Molecular and Biochemical Parasitology* 120: 291–296.
- [16] Hotez P.J., Ashcom J., Zhan B., Bethony J., Loukas A., Hawdon J., Wang Y., Jin Q., Jones K.C., Dobardzic A., Dobardzic R., Bolden J., Essiet I., Brandt W., Russell P.K., Zook B.C., Howard B., Chacon M. 2003. Effect of vaccination with a recombinant fusion protein encoding an astacinlike metalloprotease (MTP-1) secreted by host-stimulated *Ancylostoma caninum* third-stage infective larvae. *Journal of Parasitology* 89: 853–855.
- [17] Zhan B., Badamchian M., Bo M.H., Ashcom J., Feng J.J., Hawdon J., Xiao S.H., Hotez P.J. 2002. Molecular cloning and purification of Ac-TMP a developmentally regulated putative tissue inhibitor of metalloproteases released in relative abundance by adult *Ancylostoma* hookworms. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 66: 238–244.
- [18] Cappello M., Hawdon J.M., Jones B.F., Kennedy W.P., Hotez P.J. 1996. Cloning and expression of *Ancylostoma caninum* anticoagulant peptide (AcAP). *Molecular and Biochemical Parasitology* 80: 113–117.
- [19] Harrison L.M., Cordova J.L., Cappello M. 2001. *Ancylostoma caninum* anticoagulant peptide-5: immunolocalization and in vitro neutralization of major hookworm anti-thrombotic. *Molecular and Biochemical Parasitology* 115: 101–107.
- [20] Mieszczanek J., Harrison L.M., Vlasuk G.P., Cappello M. 2004. Anticoagulant peptides from *Ancylostoma caninum* are immunologically distinct and localize to separate structures within the adult hookworm. *Molecular and Biochemical Parasitology* 133: 319–342.
- [21] Mieszczanek J., Harrison L.M., Cappello M. 2004. *Ancylostoma ceylanicum* anticoagulant peptide-1: role of the predicted reactive site amino acid in mediating inhibition of coagulation factors Xa and VIIa. *Molecular and Biochemical Parasitology* 137: 151–159.
- [22] Chadderdon R.C., Cappello M. 1999. The hookworm platelet inhibitor: functional blockade of integrins GPIIb/IIIa (alphaIIb beta3) and GPIa/IIa (alpha2beta1) inhibits platelet aggregation and adhesion in vitro. *The Journal of Infectious Diseases* 179: 1235–1241.
- [23] Ali F., Brown A., Stanssens P., Timothy L.M., Soule H.R., Pritchard D.I. 2001. Vaccination with neutrophil inhibitory factor reduces the fecundity of the hookworm *Ancylostoma ceylanicum*. *Parasite Immunology* 23: 237–249.
- [24] Milestone A.M., Harrison L.M., Bungiro R.D., Kuzmic P., Cappello M. 2000. A broad spectrum Kunitz type serine protease inhibitor secreted by the hookworm *Ancylostoma ceylanicum*. *The Journal of Biological Chemistry* 275: 29391–29399.
- [25] Chu D., Bungiro R.D., Ibanez M., Harrison L.M., Campodonico E., Jones B.F., Mieszczanek J., Kuzmic P., Cappello M. 2004. Molecular characterization of *Ancylostoma ceylanicum* Kunitz-type serine protease inhibitor: evidence for a role in hookworm-associated growth delay. *Infection and Immunity* 72: 2214–2221.
- [26] Bungiro R.D., Green J., Kruglov E., Cappello M. 2001. Mitigation of hookworm disease by immunization with soluble extracts of *Ancylostoma ceylanicum*. *The Journal of Infectious Diseases* 183: 1380–1387.
- [27] Bungiro R.D., Harrison L.M., Cappello M. 2002. *Ancylostoma ceylanicum* excretory/secretory protein 1: purification and molecular cloning of a major secretory protein from adult hookworms. *Molecular and Biochemical Parasitology* 119: 147–151.
- [28] Munn E.A. 1977. A helical, polymeric extracellular protein associated with the luminal surface of *Haemonchus contortus* intestinal cells. *Tissue Cell* 9: 23–34.
- [29] Munn E.A., Greenwood C.A., Coadwell W.J. 1987. Vaccination of young lambs by means of a protein fraction extracted from adult *Haemonchus contortus*. *Parasitology* 94: 385–397.
- [30] Longbottom D., Redmond D.L., Russel M., Liddell S., Smith W.D., Knox D.P. 1997. Molecular cloning and characterization of a putative aspartate proteinase associated with gut membrane protein complex from adult *Haemonchus contortus*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 88: 63–72.
- [31] Redmond D.L., Knox D.P., Newlands G., Smith W.D., 1997. Molecular cloning of a developmentally regulated putative metalloproteinase present in a host protective extract of *Haemonchus contortus*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 85: 77–87.
- [32] Smith W.D., Smith S.K., Murray J.M. 1994. Protection studies with integral membrane fractions of *Haemonchus contortus*. *Parasite Immunology* 16: 231–241.
- [33] Jones B.F., Hotez P.J. 2002. Molecular cloning and characterization of Ac-MEP-1, a developmentally regulated gut luminal metalloendopeptidase from adult *Ancylostoma caninum* hookworm. *Molecular and Biochemical Parasitology* 119: 107–116.
- [34] Harrop S.A., Sawangjaroen N., Prociv P., Brindley P.J. 1995. Characterization and localization of cathe-

- psin B proteinases expressed by adult *Ancylostoma caninum* hookworms. *Molecular and Biochemical Parasitology* 71: 163–171.
- [35] Loukas A., Dowd A.J., Prociv P., Brindley P.J. 2000. Purification of a diagnostic, secreted cysteine protease-like protein from the hookworm *Ancylostoma caninum*. *Parasitology International* 49: 327–333.
- [36] Harrop S.A., Prociv P., Brindley P.J. 1996. *Acasp*, a gene encoding a cathepsin D-like aspartic protease from the hookworm *Ancylostoma caninum*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 227: 294–302.
- [37] Williamson A.L., Brindley P.J., Abbenante G., Prociv P., Berry C., Girdwood K., Pritchard D.I., Fairlie D.P., Hotez P.J., Dalton J.P., Loukas A. 2002. Cleavage of hemoglobin by hookworm cathepsin D aspartic proteases and its potential contribution to host specificity. *The FASEB Journal* 16: 1458–1460.
- [38] Williamson A.L., Brindley P.J., Loukas A. 2003. Hookworm cathepsin D aspartic proteases: contributing roles in the host-specific degradation of serum proteins and skin macromolecules. *Parasitology* 126: 179–183.
- [39] Williamson A.L., Brindley P.J., Abbenante G., Datu B.J.D., Prociv P., Berry C., Girdwood K., Pritchard D.I., Fairlie D.P., Hotez P.J., Zhan B., Loukas A. 2003. Hookworm aspartic protease, Na-APR-2, cleaves human hemoglobin and serum proteins in a host-specific fashion. *The Journal of Infectious Diseases* 187: 484–94.
- [40] Wiśniewski M., Zatorska A., Wędrychowicz H. 2004. Proteazy asparaginianowe tęgoryjców i ich biologiczna rola w układzie pasożyt — żywiciel. *Medycyna Weterynaryjna* 60: 808–811.
- [41] Dalton J.P., Brindley P.J., Knox D.P., Brady C.P., Hotez P.J., Donnelly S., O'Neill S.M., Mulcahy G., Loukas A. 2003. Helminth vaccines: from mining genomic information for vaccine targets to systems used for protein expression. *International Journal for Parasitology* 33: 621–640.

Wpłynęło 10 lipca 2006

Zaakceptowano 24 lipca 2006